Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile, 38: 123-128. (1981)

INFLUENCIA DE LA EDAD Y DEL TAMAÑO DE LA AMPUTACION EN LA REGENERACION DE APENDICES LOCOMOTORES DE *BACTERIA GRANULICOLLIS* BLANCHARD (PHASMIDAE, PHASMIDA)

ARIEL CAMOUSSEIGHT M.* SERGIO ZAPATA C.**

RESUMEN

Se presentan nuevas experiencias relacionadas con la regeneración de apéndices en *Bacteria granulicollis* BLANCHARD. En esta oportunidad el fenómeno de regeneración ha sido relacionado con la edad, el nivel y época del año en que se practica la amputación.

Del análisis cuantitativo se concluye que, hay una relación directa entre el mayor nivel de amputación y la autotomía, y que a menor edad es mayor la posibilidad de regeneración. Se establece, además, épocas favorables y desfavorables en el año en relación a las fechas de amputación o autotomía.

ABSTRACT

New experiments about the regeneration of appendixes in *Bacteria granulicollis* BLANCHARD are presented. During these experiments the regeneration phenomenon has been studied in relation to age, level and time of year at which the amputation is practiced.

From the quantitative analysis it may be concluded that there is a direct correspondence between the higher level of the amputation and autotomy, and that at a younger age there is a greater possibility of regeneration.

Furthermore it was possible to establish more and less favorable times of year in relation to the date of amputation or autotomy.

INTRODUCCION

Al estudiar la autotomía inducida, por evasión de un obstáculo que impedía el normal desplazamiento en los ejemplares de *B. granulicollis* (ZAPATA y CAMOUSSEIGHT 1977), se observó la capacidad de regenerar miembros morfológica o funcionalmente normales.

Esta capacidad de regenerar miembros está ampliamente representada en los artrópodos y en particular en los insectos (BORDAGE 1905). Otras investigaciones (BART 1972), han determinado que el proceso de restablecimiento llevado a cabo, luego de una autotomía o amputación puede variar de manera importante entre grupos de insectos e incluso adoptar soluciones diferentes para los distintos órganos de un mismo individuo, aún entre insectos filogenéticamente muy emparentados.

* Sección Entomología, Museo Nacional de Historia Natural. Casilla 787. Santiago.

** Departamento de Biología, Academia Superior de Ciencias Pedagógicas de Santiago. Casilla 147, Santiago-Chile.

Específicamente, la regeneración de apéndices locomotores que nos preocupa, estaría influída, como lo señalara CHOPARD (1938), por el nivel de ruptura del miembro y la edad del individuo en el momento de la amputación.

En esta oportunidad deseamos presentar los resultados cuantitativos, de la regeneración observada al amputar en tres niveles distintos, la extremidad metatorácica derecha de *B. granulicollis* y además, las observaciones de la amputación de un tarso metatorácico en diferentes etapas ontogenéticas, de la misma especie.

METODOLOGIA

Los animales en el primer estadio del desarrollo, se obtuvieron de una crianza estable que se encuentra en el Departamento de Biología de la Academia Superior de Ciencias Pedagógicas de Santiago (ZAPATA 1970).

La temperatura ambiente en que se encuentra la crianza, fluctúa entre 18-25 °C en verano y 16-22 °C en invierno; la humedad es mantenida con el agua de los frascos con alimento y en el invierno con la permanente evaporación de frascos colocados sobre estufas.

Las amputaciones se efectuaron por corte con tijera fina, sin anestesia.

Los individuos amputados fueron aislados en frascos de vidrio, individuales, de 1 l. de capacidad. Alimentándolos con ramillas frescas de *Muehlenbeckia hastulata*, de aproximadamente 10-13 cm de largo, dos veces por semana.

Los controles de cada grupo experimental se realizaron día por medio, durante un período aproximado de 2 meses.

Los 101 ejemplares estudiados se distribuyeron de la siguiente forma: 11 y 10 individuos con amputación a nivel de tarso-tibia, 19 y 8 con amputación en la mitad de la tibia y 15 individuos con amputación a nivel de tibia-fémur. 10 ejemplares con amputación del tarso metatorácico derecho, efectuada a los 15 días después del nacimiento, 8 a los 22 días, 10 a los 40 días y 10 a los 50 días.

RESULTADOS

Epoca del año en que se efectúa la amputación y regeneración:

En el establecimiento de los tres grupos experimentales (Cuadro 1), se debió operar en diferentes épocas del año. Dadas las condiciones estandarizadas en que se encuentra la crianza de *B. granulicollis*, se pensó que esta diferencia de épocas, no incidiría en el resultado de la regeneración. Al observar los períodos de regeneración en los subgrupos tarso y media tibia amputados y sometiéndolos al test de t de Student, con un nivel de significación de 5%, vemos que las diferencias en ambos casos tienen una $P > 0.05$, estadísticamente significativa. Denotando un aumento en la velocidad de regeneración de los miembros amputados en marzo-abril sobre los de junio-julio.

Además, los porcentajes de autotomía (Cuadro 1) disminuyen en los ejemplares con el tarso amputado en abril, en los cuales sólo 3 ejemplares de 11, autotomizan, en tanto que los operados en junio autotomizan 6 de 10. En ambos la autotomía postoperatoria del muñón, ocurre en promedio, a los 12.0 y 10.5 días respectivamente. El sexo, reconocible en estados avanzados del desarrollo, es independiente del desarrollo, es independiente del proceso de autotomización. Esto último fue ratificado sometiendo los atributos sexo y autotomía a la prueba de chi cuadrado, con $\alpha = 5\%$.

Considerando que la amputación del tarso desencadena una rápida regeneración en *Triatoma infestans* (CORREA, 1961) y en *Blabera craniifer* (BULLIÉRE, 1967) y que para *B. granulicollis* la amputación de este segmento conduce a un 100% de regeneración normal, entendiendo por tal un apéndice locomotor igual al contralateral o miniaturizado (ZAPATA y CAMOUSSEIGHT 1977), independientemente de que sufran una posterior autotomía del muñón, que no altera la velocidad de reposición como se ratifica al someter a un análisis de varianza para pocos datos, con nivel de significación de 5%, los períodos de regeneración de los 3 individuos que autotomizan ($\bar{x} = 56$ días), y de los 8 que no autotomizan ($\bar{x} = 57.6$ días) en el subgrupo tarso amputado el 24.4.78. Y que además, como se demostró, el sexo no es determinante de la autotomización, ni hay aumento de días en la eliminación del muñón luego de la amputación, podemos aceptar que la época del año en que se efectúe la amputación y/o la autotomía, estaría intervi-

CUADRO 1. Amputación de la 3ª pata derecha a diferentes niveles en primer estadio de *B. granulicollis* Bl.

	NUMERO INDIVIDUOS	FECHA DE AMPUTACION	♂/♀	% AUTOTOMIA	% REGENERACION NORMAL	PERIODO DE REGENERACION $\bar{x}$ (DIAS)
	11	24-4-78	8/3	27.2	100	56 ± 2.1
	10	27-6-78	7/3	60.0		67.9 ± 2.6
	19	29-3-79	10/9	94.7	100	65.3 ± 0.9
	8	6-7-78	6/2	87.5		91.3 ± 5.8
	15	26-6-79	6/9	93.3	93.3	75.2 ± 2.2*

*Solo se consideraron 14 individuos, ya que uno de ellos no regeneró

niendo en el proceso de reposición de tal modo de acelerar o retardar dicho proceso.

Nivel de la amputación y regeneración:

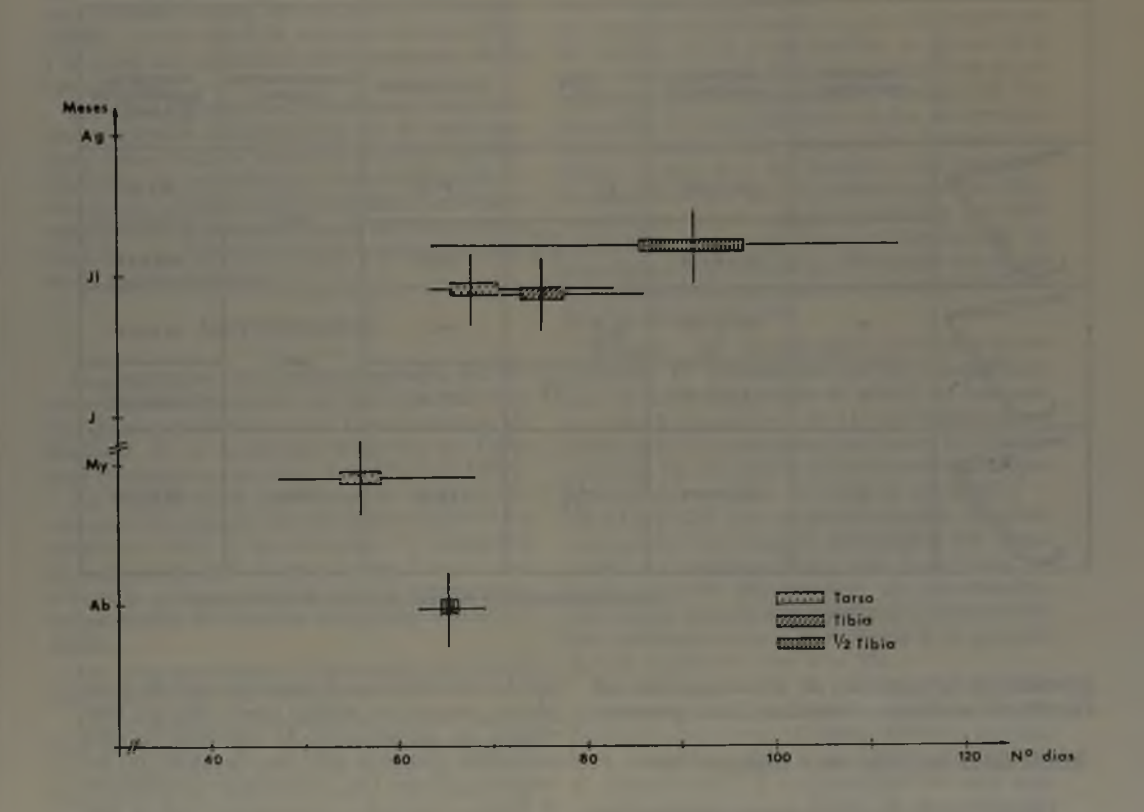
Considerando las variaciones estacionales, se sometieron los períodos de regeneración (Cuadro 1) de los tres niveles de amputación (27.6.78, 6.7.78 y 26.6.79) a un análisis de varianza con nivel de significación de 5%. De igual modo se procedió para dos niveles, en los grupos 24.4.78 y 29.3.79. Obteniéndose un $F = 9.87$ y $F = 33.44$ respectivamente, mayores a los F de Tabla. Ratificando el aumento en días, de la regeneración en los apéndices con un mayor trozo amputado (Fig. 1) en una misma época del año y en un mismo estadio de la vida larvaria, con o sin autotomización postoperatoria del muñón.

Los porcentajes de autotomía se incrementan (Cuadro 1), al aumentar el tamaño de la amputación. Incluso a nivel de tarso, si se varía la época en que se efectúa. A nivel de media tibia, los porcentajes están influidos por la variación en el número total de ejemplares, porque en ambos casos sólo un individuos no autotomizó. Al amputar la tibia completa, también sólo un ejemplar no autotomiza. Estos tres ejemplares regeneraron el trozo amputado, comenzando por la aparición de un tarso tetrámero bien diferenciado, para luego aumentar la longitud de la tibia, llegando a igualar el tamaño del apéndice contralateral, considerado control (BULLIÈRE 1967), excepto en el amputado a la altura de la articulación tibia-fémur, que alcanzó aproximadamente a la mitad de la longitud total.

Los períodos de tiempo promedio, que demoraron en autotomizar los muñones, los ejemplares con media tibia amputada fue de 7 días, en tanto que los con amputación a nivel de articulación tibia-fémur, fue de 11 días.

En la columna "regeneración normal", el valor 93.3, no considera un ejemplar que autotomizó y que no presentó una posterior regeneración.

FIG. 1 PERIODOS DE REGENERACION



De los resultados planteados se desprende que *B. granulicollis* puede regenerar un tarso amputado, no como un hecho improbable para los fásmidos, como lo señalara BORDAGE (1905), sino de la misma manera como ha sido determinado en las especies *Blabera craniifer* (BULLIÉRE *op. cit.*) y *Triatoma infestans* (CORRÊA *op. cit.*). A pesar de que en ciertas épocas del año aumenten los casos de autotomía postoperatoria del muñón. Por otra parte, la prolongación del período de reposición, a pesar de que casi la totalidad de los individuos autotomizan en un período breve postoperatorio, señalaría la dificultad de regenerar al amputar en el tramo comprendido entre las articulaciones tarso-tibia y tibia-fémur. Sin que por ello podamos decir que en este tramo no se produzca reposición, considerando los porcentajes 7.4 y 6.7, observados en los grupos media tibia y tibia amputadas respectivamente, con regeneración y sin autotomía. Resultados éstos que estarían de acuerdo con los encontrados en las especies anteriormente señaladas.

Edad en que se efectúa la amputación y regeneración

Los grupos experimentales (Cuadro 2) se establecieron entre el 21.9.78 y el 28.11.78. Las edades estudiadas, están en relación con el promedio de días que dura, aproximadamente, el período de interfase entre una muda y otra (25 días). Deducido del promedio, que demora una hembra (150 días) en alcan-

CUADRO 2. AMPUTACION DEL TARSO METATORACICO DERECHO EN NINFAS DE DIFERENTES EDADES

EDAD (DIAS)	Nº EJEMPLARES	% AUTOTOMIA	% REGENERACION	% SIN REGENERACION O ANORMAL	$\bar{X}$ (DIAS) PERIODO REGENERACION
15	10	50	100	–	48.4 ± 0.9
22	8	75	100	–	37.9 ± 2.7
40	10	30	20	80	47.3 ± 1.8*
50	10	30	10	90	51.6 ± 12.5*

* Estos $\bar{x}$ están calculados considerando (3°) 4 y (4°) 3 ejemplares

zar el estadio imaginal luego de la sexta muda (ZAPATA 1970). Por lo tanto, las edades estudiadas corresponderían a la primera y segunda interfase ninfal.

Se han utilizado estos valores, en la imposibilidad de determinar el momento exacto de la muda, porque a pesar de ser fitófagos, comen sus exuvias de preferencia en horas de la noche.

Los períodos promedios de regeneración, de los dos primeros grupos, fueron sometidos al test de t de Student, con un nivel de significación de 5%, resultando una $P > 0.05$, estadísticamente significativa. Los mismos períodos para los grupos 3º y 4º basados en 3 y 4 ejemplares que presentaron regeneración normal y anormal, no son considerados.

Los porcentajes de autotomía en la primera interfase, aumentan en un 25% al aproximarse la muda postoperatoria. Obteniéndose un 100% de regeneración normal en ambos casos, con una notoria aceleración en el proceso de reposición al final de la interfase.

En la segunda interfase, los porcentajes de autotomía decrecen a un 30%, en tanto que el proceso de reposición, indistintamente que los ejemplares hubieran o no autoto-

mizado, decrece en un 80% en la primera etapa y hasta un 90% al final de la misma.

Se destaca el brusco cambio observado entre los amputados a los 22 y 40 días, período entre los cuales ocurre la muda postoperatoria. Dada la variabilidad en número de días en que puede suceder ésta en *B. granulicollis*, la diferencia de 18 días nos da confianza como para inferir, que todos los ejemplares luego de 40 días de nacidos, han debido sufrir por primera vez este proceso.

Con los resultados obtenidos, podríamos establecer la existencia de por lo menos dos fases del poder de regeneración (BULLIÉRE 1968) en un apéndice locomotor metatorácico, limitado casi en su totalidad a la primera intermuda y con variación en la velocidad de regeneración en cada fase (mayor en la segunda). En la segunda intermuda, este poder de regeneración, está prácticamente anulado, considerando los altos porcentajes de no autotomía (70%) y de sin regeneración o anormal (80-90%).

CONCLUSIONES

La regeneración de apéndices locomotores de *B. granulicollis* está ligada a la época del año en que se practique amputación de un trozo del apéndice o su autotomía, independientemente de las condiciones estandarizadas de un laboratorio.

La especie estudiada presenta regeneración de trozos amputados en el período anterior a la primera muda, a nivel de la articulación tarso-tibia, media tibia y articulación tibia-fémur a pesar que, para los dos últimos tramos considerados, dicho proceso sea casi nulo, recurriendo a la autotomía postoperatoria, que permite en la mayor parte de los casos, la obtención de un miembro regenerado, normal.

Los períodos de reposición de un tarso amputado o de un apéndice autotomizado, en ejemplares recién nacidos, independiente de su sexo, son semejantes.

La probabilidad de regenerar un tarso está estrechamente ligada al momento en que se realice la amputación. Es mayor en una primera etapa, más alejada de la primera muda de piel, para disminuir en una segunda etapa más próxima a la muda postoperatoria, con un notorio aumento de la autotomía.

Las amputaciones y/o autotomía practicadas luego de ocurrida la primera muda ninfal no permiten prácticamente, un proceso de reposición o a lo sumo una expresión muy rudimentaria de regeneración.

AGRADECIMIENTOS

Compromete nuestra gratitud la gentil colaboración prestada por la Sra. SERENA MANN F., de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BART, A.

1972 Déclenchement de régéneration chez deux Phasmes: *Carausius morosus* Br. et *Sipyloidea sipylus* WESTW. Bull. Soc. Zool. France 97(3): 343-350.

BORDAGE, E.

1905 Recherches anatomiques et biologiques sur l'autotomie et la régénération chez divers Arthopodes. Bull. Sc. Fr. Belg., 39: 307-454.

BULLIÈRE, D.

1967 Etude de la régéneration chez un insecte Blattoptéroide, *Blabera craniifer* BURM. (Dictyoptère). I. Influence du niveau de la section sur la régénération de la patte métathoracique. Bull. Soc. Zool. France 92 *(3):* 523-536.

1968 Ibid. II. Influence du moment de l'amputation dans l'intermue sur la régénération de la patte métathoracique". Bull. Soc. Zool. France 93(1): 69-82.

CHOPARD, L.

1938 La biologie des Orthoptères. Enc. Ent. 20: 330-346.

CORRÊA, F.

1961 Estudios sôbre a regeneraçâo das pernas do *Triatoma infestants* (KLUG, 1834) Hem., Reduviidae). Papéis avulsos Dep. Zool. Sao Paulo. 14(28): 255-261.

ZAPATA, S.

1970 Biología y morfología de *Bacteria granulicollis* Bl. Pub. Cent. Est. Ent. Univ. Chile 10: 23-42.

ZAPATA, S. y A. CAMOUSSEIGHT

1977 Autotomía evasiva inducida, en *B. granulicollis* Bl. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile 35: 73-78.